



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 196 31 997 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁶:
C 12 M 3/00
C 12 M 1/22

②1 Aktenzeichen: 196 31 997.8
②2 Anmeldetag: 8. 8. 96
④3 Offenlegungstag: 12. 2. 98

DE 196 31 997 A 1

⑦1 Anmelder:
Dornier GmbH, 88048 Friedrichshafen, DE

⑦2 Erfinder:
Hager, Rudolf, Dipl.-Biol., 88090 Immenstaad, DE;
Hiesgen, Norbert, Dipl.-Ing., 88048 Friedrichshafen,
DE; Kübler, Ulrich, Dipl.-Ing., 88677 Markdorf, DE;
Willich, Georg, Dr.-Ing., 88090 Immenstaad, DE

⑤6 Entgegenhaltungen:
Chem. Tech. (Heidelberg) 1993, 22, 10, Suppl.
S.74-75;

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑤4 Mikrogravitationstaugliches Verfahren und Vorrichtung zur Prozessierung von Zellkulturen, die sich in Standard-Kulturgefäßen befinden
- ⑤7 Mikrogravitationstaugliches Verfahren zur Prozessierung von Zellkulturen, die sich in geschlossenen Standard-Kulturgefäßen befinden, wobei die Prozeßflüssigkeit innerhalb des Kulturgefäßes zerstäubt und versprüht wird.

DE 196 31 997 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Prozessierung von Zellkulturen, die sich in geschlossenen Standard-Kulturgefäßen befinden.

Bei der Kultivierung von Zellen in Standardkulturgefäßen wie z. B. Petrischalen erfolgt das Wachstum meist an der Oberfläche der Schale oder auf einem (festen, gelartigen) Nährboden, z. B. Agar. Die Prozessierung der Kultur erfolgt meist über einen Flüssigkeitstransfer.

Sollen in der bemannten oder unbemannten Raumfahrt derartige Experimente durchgeführt werden, so ist ein normales Pipettieren nicht möglich, weil die Flüssigkeitstropfen nicht zu den Zellkulturen gelangen. In der bemannten Raumfahrt verlangen die Sicherheitsanforderungen den hermetischen Einschluß aller als gefährlich eingestuften Substanzen.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren und eine Vorrichtung für die Zellkultivierung unter Schwerelosigkeit zu schaffen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Patentansprüche gelöst, wobei die Unteransprüche vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung betreffen.

Die erfindungsgemäße Sprühprozessierung von Zellkulturen in Standard-Kulturgefäßen findet beispielsweise Anwendung bei:

- der Zellkultivierung unter Schwerelosigkeit;

Vorteile:

- Benetzung der Kulturen durch Besprühen ist unabhängig vom g-Vektor,
- keine Probleme mit Lufteinschlüssen (Blasenbildung) an der Kultur wie bei der Immersion,
- Funktion auch mit kleinen Medienvolumina gewährleistet,
- durch geringere Medienvolumina auch geringere Verdrängung der Gasphase, keine Behälter für Abluft notwendig,
- einfache Handhabung durch den Astronauten,
- genaue Dosierung möglich.

- der Zellkultivierung von pathogenen Keimen und/oder toxischen Medien in hermetisch abgeschlossenen (Standard-)Gefäßen;

Vorteile:

- keine Probleme mit Lufteinschlüssen (Blasenbildung) an der Kultur wie bei der Immersion,
- Funktion auch mit kleinen Medienvolumina gewährleistet,
- durch geringere Medienvolumina auch geringere Verdrängung der Gasphase, keine Behälter für Abluft notwendig,
- genaue Dosierung möglich,
- auslaufsicher, kein Umkippen/Verschütten möglich,
- Experimentieren mit pathogenen/toxischen Substanzen in normaler Laborumgebung,
- preisgünstiges Pipettieren durch Einsatz kommerzieller Pumpzerstäuber,
- basiert auf Standardbehältern, daher volle Übertragbarkeit der Ergebnisse.

- Als Fixierbehälter für Zellkulturen und Gewebeteile zur gleichmäßigen Benetzung mit Fixativ;

Vorteile:

- Benetzung der Kulturen oder Gewebeteile durch Besprühen ist unabhängig vom g-Vektor,
- keine Probleme mit Lufteinschlüssen (Blasenbildung) an der Kultur wie bei der Immersion,
- Funktion auch mit kleinen Medienvolumina gewährleistet,
- durch geringere Medienvolumina auch geringere Verdrängung der Gasphase, keine Behälter für Abluft notwendig,
- Experimentieren mit pathogenen/toxischen Substanzen in normaler Laborumgebung,
- preisgünstiges Pipettieren durch Einsatz kommerzieller Pumpzerstäuber.

Beim Gegenstand der Erfindung verhindert die fehlende Gravitation ein normales Pipettieren und die Sicherheitsanforderungen der bemannten Raumfahrt verlangen den hermetischen Einschluß aller als gefährlich eingestuften Substanzen. Die erfindungsgemäße Sprühprozessierung ermöglicht einerseits ein gleichmäßiges Benetzen der Kulturfläche und es kann mit sehr geringen Volumina gearbeitet werden. Dies ermöglicht es, Flüssigkeiten in ein hermetisch geschlossenes Gefäß einzusprühen bei einem nur geringen Anstieg des Innendrucks. Das Verfahren kann auch zur Fixierung von Geweben wie z. B. Pflanzenteilen verwendet werden, wie es in Raumfahrtexperimenten ebenfalls vorkommt.

Die Vorteile der Sprühfixierung können auch in der terrestrischen Forschung zum Tragen kommen, vor allem beim Arbeiten mit pathogenen/toxischen Substanzen. Ein Bereich, der mit der Weiterentwicklung die Biotechnologie (z. B. Genmanipulationen) immer wichtiger wird.

Die Erfindung wird anhand von Fig. näher erläutert.

Es zeigen:

Fig. 1 Prinzip Sprühbenetzung der Kulturfläche mit flüssigen Medien,

Fig. 2 Drehbewegung des Deckels inclusive Sprühkopf zur Benetzung großer Flächen in Abhängigkeit vom Sprühwinkel,

Fig. 3 mit Prozeßflüssigkeit vorgefüllte Pumpflaschen,

Fig. 4 Prinzip Pumpflasche und Schnittstelle Pumpflasche/Prozeßkammer,

Fig. 5 Gesamtkonfiguration einer hermetisch abgedichteten Prozeßkammer mit kommerziellen Petrischalen als Kulturboden,

Fig. 6 Gesamtkonfiguration einer hermetisch abgedichteten Prozeßkammer mit Agar als Nährboden,

Fig. 7 Gasaustausch während des Kultivierung über Porenmembrane (Version A),

Fig. 8 Gasaustausch während des Kultivierung über Gewindedurchbruch (Version B).

Der Gegenstand der Erfindung besteht aus der Kombination von einem Pumpzerstäuber 3 mit einem Standard-Kulturgefäß 1, z. B. Petrischale. Eine Pumpflasche 2 ist über die Schnittstelle Pumpkopf/Sprühkopf 10 an den Deckel der Schale mit Sprühkopf 4 gekoppelt. Durch eine Relativbewegung von Pumpflasche 2 und Pumpkopf 18 (Pumpbewegung 8) wird ein Sprühnebel 6 erzeugt. Dieser ist "airless", das heißt es wird keine Luft

mitbefördert. Die Ausbreitung des Sprühnebels hängt u. a. vom Öffnungswinkel des Sprühkopfes 4 ab.

Aufgrund der geometrischen Verhältnisse einer Petrischale ergibt sich je nach Winkel und Durchmesser der Schale eventuell die Notwendigkeit, die benetzte Fläche durch mehrmaliges Sprühen zu vergrößern. Dazu kann der Deckel durch eine Drehbewegung 14 in mehrere Positionen gebracht werden.

Das Ankoppeln der Pumpflasche mit vorbefüllten Medien erfolgt über ein Kanülen/Septen Interface. Die Kanüle 16 ist mit einem Kontaminationsschutz 20 versehen, der die Kanüle erst beim Eindringen ins Septum 22 freigibt. Nach dem Durchstoßen des Septums erfolgt die Ankopplung an die Düse 24. Die vorbefüllten Flüssigkeiten in den Pumpflaschen befinden sich in einem Medienbeutel 28, dadurch erfolgt die Ansaugung über den Saugrüssel 26 immer blasenfrei; auch bei Überkopfbetrieb oder unter Schwerelosigkeit. Das Gehäuse ist auf die jeweilige Standard-Kulturschale 1 abgestimmt. Bei der Verwendung von Petrischalen wird das kommerziell erhältliche Unterteil zwischen einen transparenten Deckel 30 und eine transparente Gehäuseschale 32 verschraubt. Die Abdichtung erfolgt über einen O-Ring 34. Durch die Verwendung der kommerziellen Petrihalbschale kann die spezielle Oberfläche der Schale verwendet werden. Ist dies nicht wichtig, z. B. bei der Verwendung von Agar als Nährboden 38, kann das Gehäuse auch ohne Petrischale verwendet werden.

Der zur Kultivierung oft notwendige Gasaustausch mit der Umgebung kann über zwei Methoden erfolgen. Bei Version A erfolgt der Gasfluß 40 über eine Porenmembrane 12. Das Volumen bleibt für Flüssigkeiten stets hermetisch abgeschlossen. Bei Version B wird auch eine Abdichtung für Gase erreicht, sobald der Deckel über eine Drehbewegung fest mit dem Unterteil verschraubt wird. Der Gasfluß 42 kann nur vor der Prozessierung, z. B. Fixierung erfolgen. Dazu erfolgt die Verschraubung der Halbschalen über ein spezielles Gasaustauschgewinde 46 mit Gewindedurchbrüchen. Die Hubbewegung des Deckels beim Aufschrauben um ca. 1/2 Umdrehung führt zur Freigabe des Gasflusses 42.

Bezugszeichenliste

1 Standard-Kulturgefäß (z. B. Petrischale)	45
2 Pumpflasche	
3 Pumpzerstäuber (Kombination aus 2, 4, 10)	
4 Sprühkopf	
6 Sprühnebel	
8 Pumpbewegung	50
10 Schnittstelle Pumpkopf/Sprühkopf	
12 Druckausgleichselement (Porenmembrane)	
14 Drehbewegung	
16 Kanüle	
18 Pumpkopf	55
20 Kontaminationsschutz	
22 Septum	
24 Düse	
26 Saugrüssel	
28 Medienbeutel	60
30 Deckel	
32 Gehäuseschale	
34 O-Ring	
38 Nährboden (z. B. Agar)	
40 Gasfluß (Version A)	65
42 Gasfluß (Version B)	
44 Hubbewegung	
46 Gasaustauschgewinde	

Patentansprüche

1. Mikrogravitationstaugliches Verfahren zur Prozessierung von Zellkulturen, die sich in geschlossenen Standard-Kulturgefäßen befinden, dadurch gekennzeichnet, daß die Prozeßflüssigkeit innerhalb des Kulturgefäßes zerstäubt und versprüht wird.
2. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Standard-Kulturgefäß (Petrischale) mit einem Deckel gasdicht verschlossen und im Deckel ein Sprühkopf und ein Druckausgleichselement vorhanden ist.
3. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das gasdicht verschlossene Standard-Kulturgefäß über ein Gasaustauschgewinde (46) zur Umgebung geöffnet werden kann.
4. Vorrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Sprühkopf sich innerhalb des Kulturgefäßes befindet und mit einer außerhalb des Kulturgefäßes befindlichen Pumpflasche mittels eines Rohres oder einer Schlauchleitung verbunden ist.
5. Vorrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß sich eine Düse innerhalb des Kulturgefäßes befindet und der Pumpkopf des Zerstäubers außerhalb des Gefäßes angeordnet ist.

Hierzu 8 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

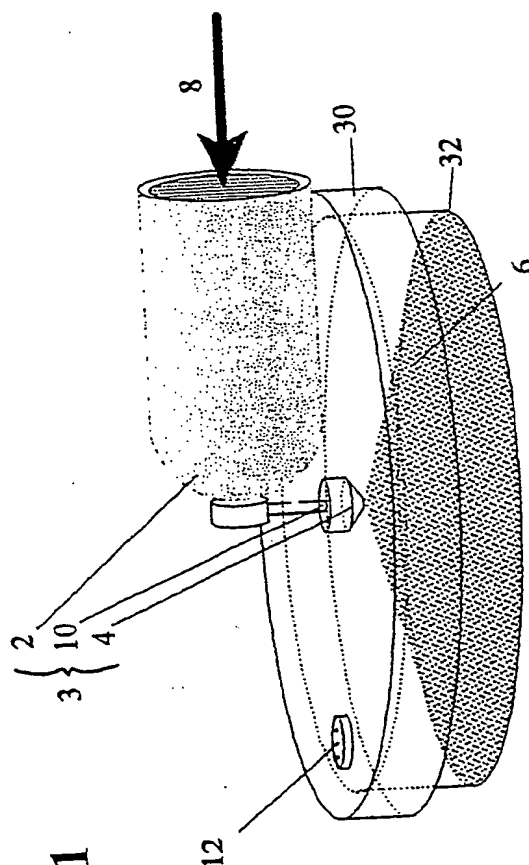


Fig. 1

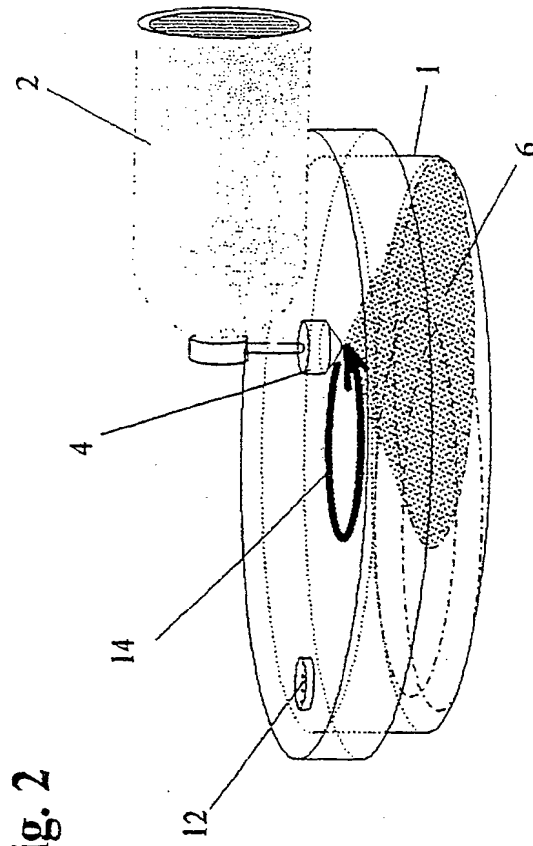


Fig. 2

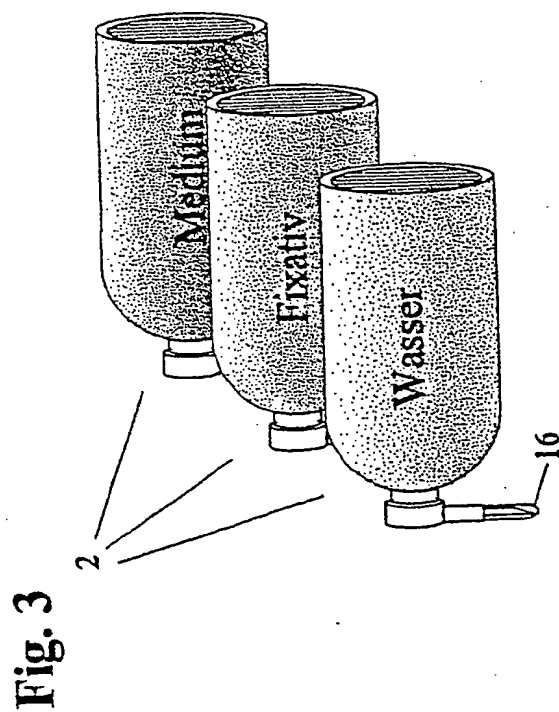
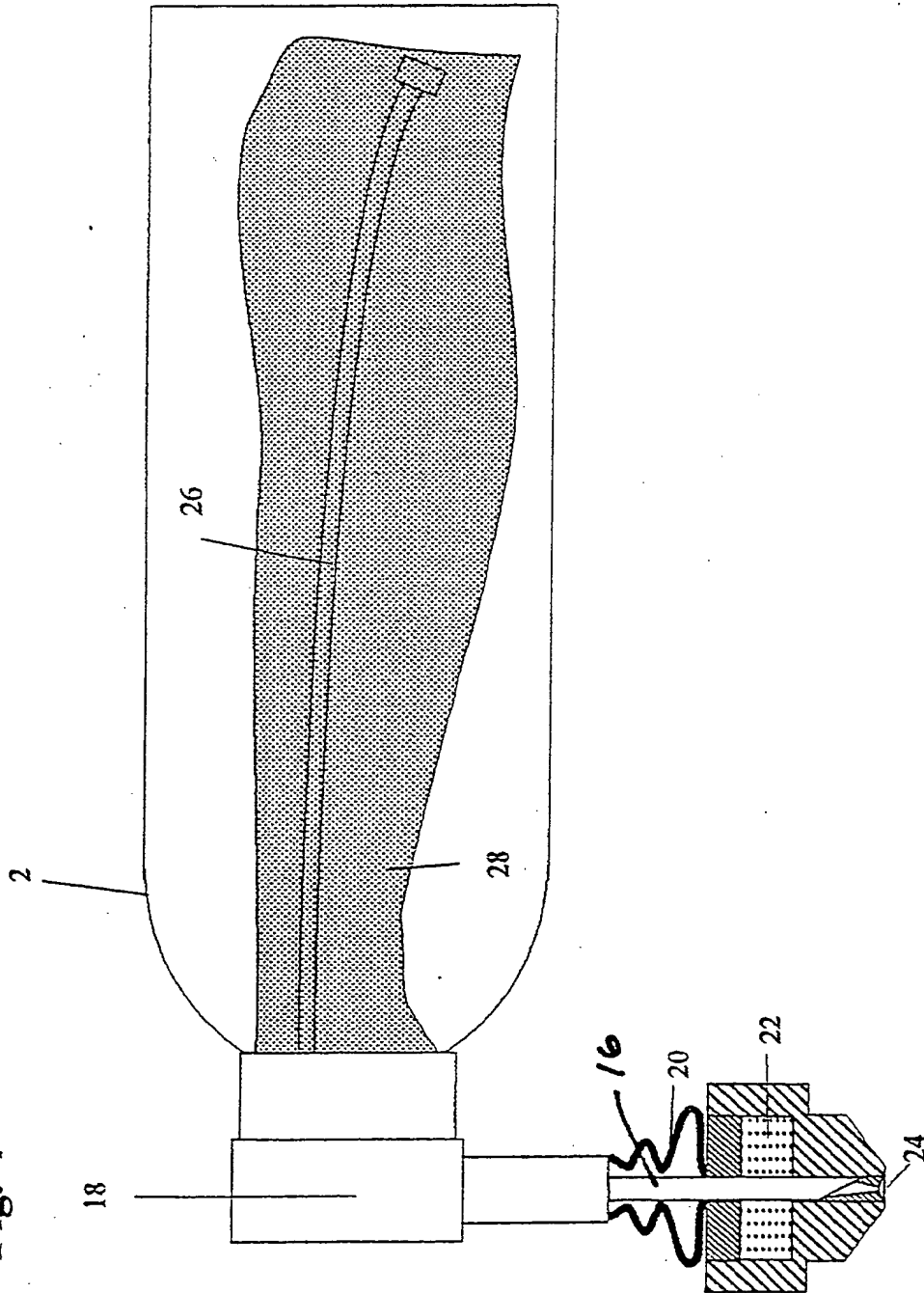


Fig. 4



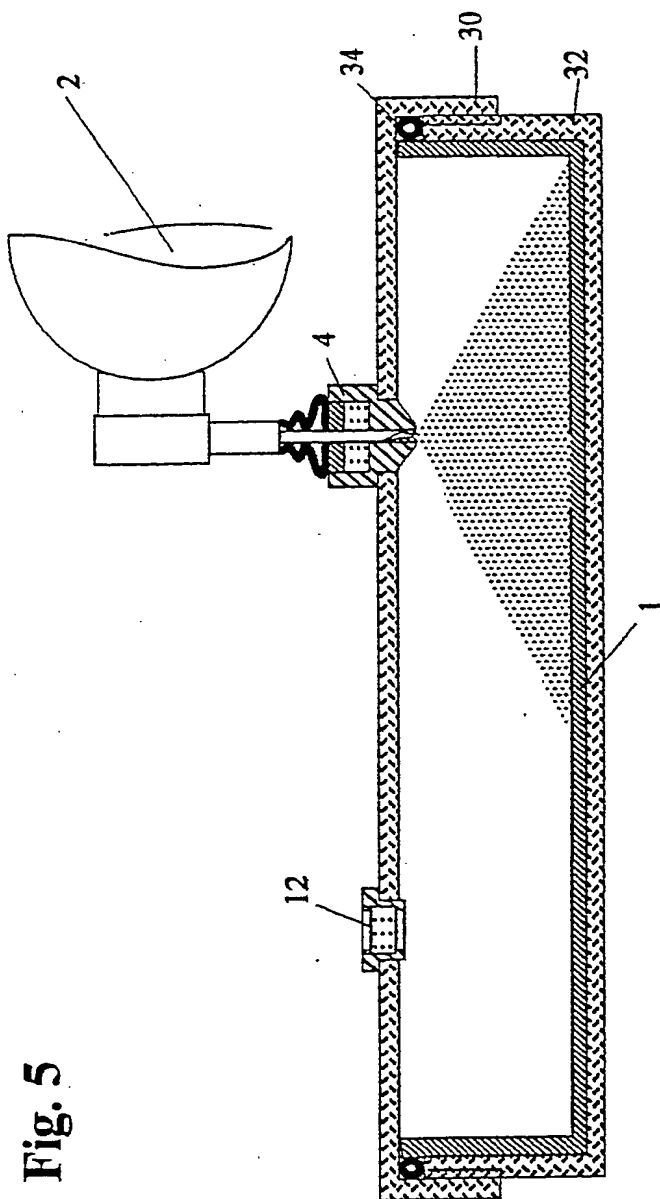
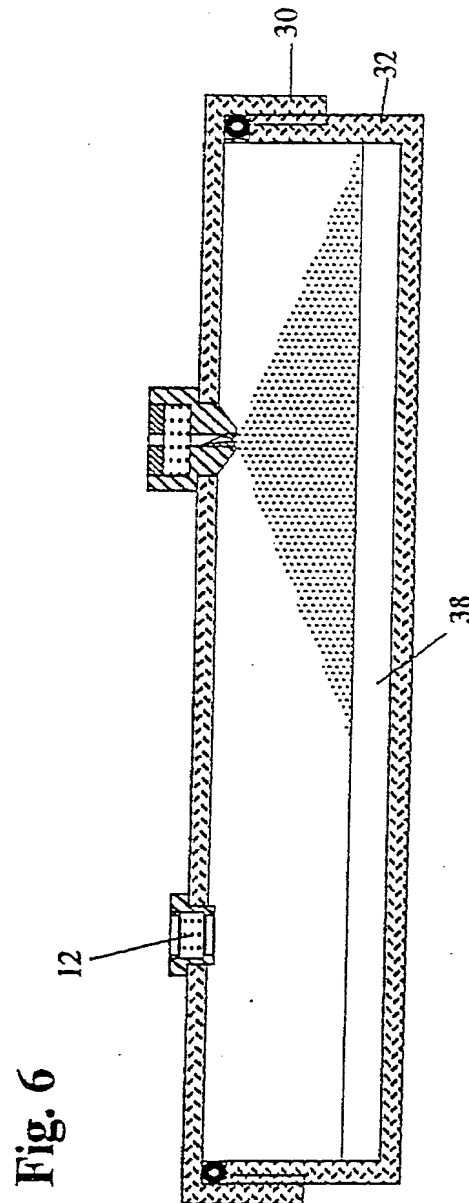


Fig. 5



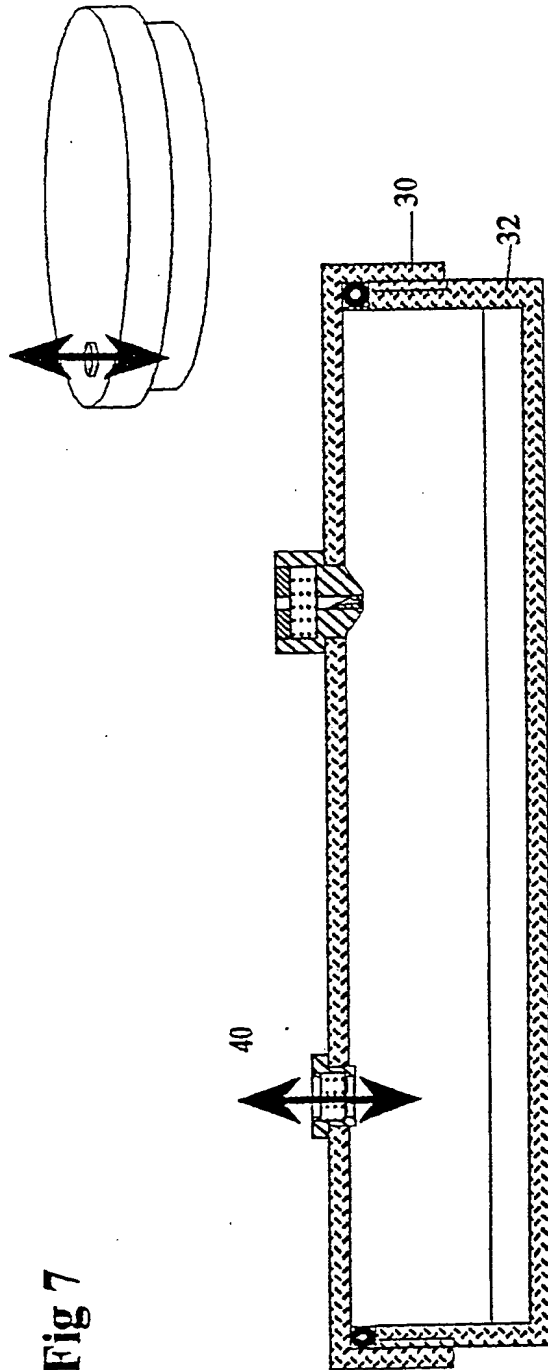


Fig 7

